

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

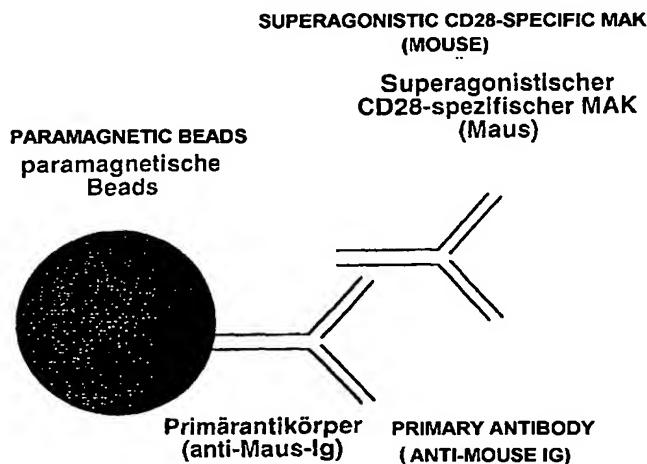
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/004768 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/44,**  
9/50
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HÜNIG, Thomas**  
[DE/DE]; Am Hohlweg 34, 97286 Winterhausen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE2003/001825**
- (74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Albrecht, Lücke  
& Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Mai 2003 (30.05.2003)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 30 223.5 4. Juli 2002 (04.07.2002) **DE**
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **TEGENERO AG** [DE/DE]; Friedrich-Bergius-Ring  
15, 97076 Würzburg (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

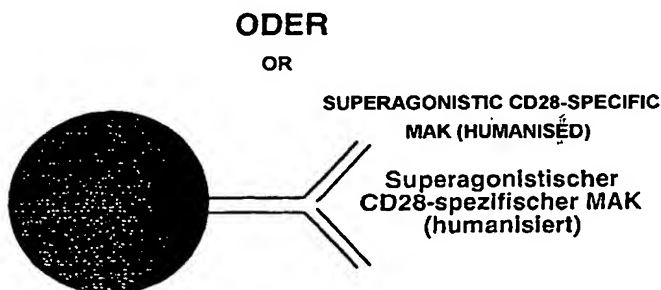
(54) Title: **MICROPARTICLE WITH CD28-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES**

(54) Bezeichnung: **MIKROPARTIKEL MIT CD28-SPEZIFISCHEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN**



(57) Abstract: The invention relates to microparticles with a support structure and CD28-specific superagonistic monoclonal antibodies (rAb) bonded to the support structure or a compound mimicking the above.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Mikropartikel mit einer Trägerstruktur sowie mit an die Trägerstruktur gebundenen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpern (rAb) oder einer Mimikryverbindung hierzu.





(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Mikropartikel mit CD28-spezifischen monoklonalen  
Antikörpern.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Mikropartikel mit einer Träger-  
struktur sowie mit einem an die Trägerstruktur gebundenen  
monoklonalen Antikörpern (mAb), Verwendungen solcher Anti-  
10 körper sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher  
Mikropartikel.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

15

Es existieren verschiedene Erkrankungen bei Warmblütern,  
menschlich oder tierisch, wobei die Anzahl verschieden-  
artiger Blutzellen gegenüber dem Gesundheitszustand verringert  
oder unzureichend aktiv ist.

20

Eine erste solche Gruppe von Erkrankungen ist eine  
pathologisch erniedrigte T-Zellzahl, insbesondere  
CD4-T-Zellzahl gemeinsam, wie beispielsweise bei AIDS oder  
leukämischen Erkrankungen in Verfolg von Chemo- oder  
25 Strahlentherapie.

Eine zweite Gruppe von Erkrankungen, bei der die Zahl oder  
die Aktivität einer bestimmten Untergruppe von T-Zellen,  
die beim gesunden Menschen die immunologische Toleranz  
30 aufrecht erhalten, verringert oder in ihrer Funktion  
gestört ist, umfaßt autoimmun-inflammatorische  
Erkrankungen. Beispiele sind rheumatoide Arthritis,  
entzündliche Darmerkrankungen, Insulin-pflichtiger

Diabetes, Multiple Sklerose sowie das Guillaian-Barré-Syndrom.

Eine dritte Gruppe von Erkrankungen wird Granulozytopenie  
5 (z.B. Neutropenie) bzw. Monozytopenie genannt und betrifft  
die Granulozyten. Als Ursachen für diese Erkrankung kommen  
in Frage: i) verminderte Granulozytopoese bzw.  
Monozytopoese (aplastische Störung) aufgrund von  
Knochenmarksschädigung, beispielsweise durch Chemikalien,  
10 wie Benzol, Medikamente, wie Zytostatika, Immunsuppressiva,  
AZT und/oder Chloramphenicol (dosisabhängig, toxisch) oder  
wie Phenylbutazon, Goldverbindungen, selten  
Chloramphenicol (dosisunabhängig durch pharmakokinetische  
Reaktionen), Strahlen oder Autoantikörper gegen  
15 Stammzellen (bei manchen Fällen von Immunneutropenie),  
aufgrund von Knochenmarksinfiltration (Leukämien,  
Karzinome, maligne Lymphome) und/oder aufgrund von  
Osteomyelosklerose, ii) Reifungsstörungen der  
Granulozytopoese, beispielsweise durch kongenitale  
20 Reifungsstörungen der Myelopoese, Kostmann-Syndrom  
(Reifungsstop der Myelopoese im Stadium des  
Promyelozyten), zyklische Neutropenie,  
Myelodysplasie-Syndrom, Vitamin B12- oder Folsäuremangel  
mit ineffektiver Granulo-, Erythro- und/oder Thrombopoese.  
25 Übliche Therapien umfassen die Gabe von Wachstumsfaktoren  
der Granulozytopoese (beispielsweise G-CSF und GM-CSF).

Eine vierte Gruppe wird Thrombozytopenie genannt. Als  
Ursachen kommen in Frage: i) verminderte Thrombozytopoese  
30 im Knochenmark (aplastische Störung bzw. verminderte Mega-  
karyozytenzahl im Knochenmark) aufgrund von Knochenmarks-  
schädigung, beispielsweise durch Chemikalien, wie Benzol,  
Medikamente, wie Zytostatika und/oder Immunsuppressiva,

Strahlen Infektionen, wie z.B. HIV, oder Autoantikörper gegen Megakaryozyten (bei manchen Fällen von Immunthrombozytopenie), aufgrund von Knochenmarksinfiltration (Leukämien, Karzinome, maligne Lymphome) und/oder aufgrund  
5 von Osteomyelose, ii) Reifungsstörungen der Megakaryozyten (Megakaryozyten im Knochenmark normal oder erhöht) mit ineffektiver Thrombo- Erythro- und/oder Granulopoese mit Megaloblasten, Riesenstäben u.a. aufgrund von Vitamin B12- oder Folsäuremangel. Übliche Therapien  
10 umfassen das Weglassen verdächtiger Medikamente, Thrombozytensubstitution (bei Bildungsstörungen im Knochenmark: Thrombopoetin) sowie MGDF (Stimulation der Proliferation und Ausreifung von Megakaryozyten.

15 Eine fünfte Gruppe bilden die aplastischen Anämien bzw. Knochenmarksversagen mit Aplasie/Hypoplasie des Knochenmarks und Panzytopenie (Stammzellenerkrankung). Eine angeborene aplastische Anämie ist beispielsweise die Fanconi-Anämie. Häufiger sind die erworbenen aplastischen  
20 Anämien, wie idiopathische aplastische Anämie (Ursache unbekannt) und sekundäre aplastische Anämien durch Medikamente, toxische Stoffe, ionisierende Strahlungen und Virusinfekte (s.o.). Supportive Therapieansätze umfassen die Substitution von Erythrozyten/Thrombozyten. Kausale  
25 Therapieansätze umfassen die Knochenmarkstransplantation oder Stammzellentransplantation, Immunsuppressive Therapien (z.B. ATG) und andere Therapiemaßnahmen, wie Gabe von Zytokinen (GM-CSF, G-CSF, MGDF, und/oder Thrombopoetin).

30

Schließlich kommt in Begleitung der akuten Leukämie oft Anämie, Thrombozytopenie und/oder Granulozytopenie, vor. Therapien umfassen die Substitution von Erythrozyten und

Thrombozyten nach Bedarf bzw. die Anregung der Granulopoese durch G-CSF und/oder GM-CSF, die Chemotherapie und Knochenmarks- und/oder Stammzellentransplantation.

5

Den vorstehenden Erkrankungen der ersten und zweiten Gruppe ist gemeinsam, daß die betroffenen Blutzellen solche sind, die CD28 auf ihrer Oberfläche tragen. Der dritten bis sechsten Gruppe ist gemeinsam, daß die  
10 betroffenen Blutzellen solche sind, die demgegenüber kein CD28 auf ihrer Oberfläche tragen.

Zum Verständnis der Erfindung ist weiterhin folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung  
15 ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung  
20 von Antigenen, z. B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie des auf allen ruhenden T-Zellen mit Ausnahme einer Untergruppe der CD8 T-Zellen des Menschen gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer  
25 Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der Costimulation der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des CD28-Moleküls mit geeigneten mAbs. Im klassischen System  
30 der Costimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist

jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Dagegen sind auch CD28-spezifische mAbs bekannt, die  
5 allein die T-Zellproliferation einleiten können. Eine  
solche superagonistische, d. h. von der Besetzung des  
Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender  
T-Lymphozyten durch CD28-spezifische mAb, wurde in  
folgenden Systemen beobachtet: in der Literaturstelle  
10 Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106  
wurde gezeigt, daß ein sehr kleiner Anteil (5 %)   
menschlicher T-Lymphozyten, die durch das Fehlen des  
Oberflächenmarkers CD45 RO der Gruppe der ruhenden  
T-Lymphozyten zugeordnet werden können, durch den  
15 normalerweise Costimulation erfordernden CD28-spezifischen  
mAb 9.3 bei Zusatz des Wachstumsfaktors Interleukin-2  
(IL-2) ohne Besetzung des Antigenrezeptors aktiviert wird.  
In der Arbeit von Siefken et al., Cellular Immunology,  
1997, 176: 59-65, wurde gezeigt, daß ein auf  
20 konventionellem Wege, d.h. durch Immunisierung von Mäusen  
mit menschlichen T-Zellen, hergestellter CD28-spezifischer  
mAb in Zellkultur eine Untergruppe menschlicher T-Zellen  
ohne Besetzung des Antigenrezeptors zur Proliferation  
aktivieren kann, wenn CD28 durch diesen mAb besetzt wird  
25 und die zellgebundenen mAb zusätzlich durch weitere  
Antikörper miteinander vernetzt werden. Den insofern  
bekannten Antikörpern ist gemeinsam, daß nur ein kleiner  
Anteil der T-Zellen aktivierbar ist.

30 In der Arbeit von Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997,  
27:239-247 wurden zwei Arten von CD28-spezifischen mono-  
klonalen Antikörpern mit unterschiedlichen funktionellen  
Eigenschaften beschrieben: costimulatorische mAb, die die

Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des Antigenrezeptors costimulieren; und superagonistische mAb, die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten aller Klassen in vitro und  
5 im Versuchstier zur Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte mAb rühren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf denen Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete unterschiedlichen Selektionen erhältlich.

10 Schließlich ist aus der Literaturstelle WO 98/54225 ein weiterer human CD28 spezifischer superagonistischer mAb bekannt, nämlich CMY-2.

Überraschenderweise lassen sich gemäß der Literaturstelle  
15 DE-100 50 935 A1 mit superagonistischen CD28-spezifischen mAb bei in vivo Applikation aber auch Blutzellen stimulieren, welche kein CD28 tragen.

Die insofern bekannten superagonistischen mAb genügen in  
20 ihrer stimulatorischen Wirkung zwar allen Anforderungen, es wäre jedoch wünschenswert, weniger mAb für einen definierten stimulatorischen Effekt zu benötigen. Darüber hinaus ist die Stimulation von T-Lymphozyten durch superagonistische CD28-spezifische mAb bisher auf zwei  
25 Systeme beschränkt, die jeweils mit Nachteilen behaftet sind: Isolierte T-Lymphozyten können in Zellkultur oft nur dann durch solche mAb stimuliert werden, wenn zuvor die Kulturschalen mit Antikörpern beschichtet wurden, die mit den eingesetzten superagonistischen mAb reagieren und die  
30 sekundär quervernetzen. Bei Verwendung ungetrennter Präparationen peripherer Blutzellen, die auch T-Lymphozyten enthalten, sowie bei in vivo Applikation können die superagonistischen mAb auch als lösliche

Substanz eingesetzt werden; dies liegt vermutlich daran, daß die sekundäre Quervernetzung durch sog. Fc-Rezeptoren auf den nicht-T-Lymphozyten erfolgt, die mit dem konstanten Teil der superagonistischen mAb, dem sog. Fc-Teil, reagieren. Diese Abhängigkeit von Fc-Rezeptoren ist u.U. wegen des variablen Anteils Fc-Rezeptor-positiver Zellen in Präparationen peripherer Blutzellen sowie wegen der durch verschiedene Fc-Rezeptor-Allele bedingten Variabilität der Antikörperbindungsfähigkeit problematisch. Darüber hinaus ist für eine wiederholte in vitro Stimulation von T-Lymphozyten durch lösliche superagonistische mAb der wiederholte Zusatz Fc-Rezeptor-exprimierender nicht-T-Zellen erforderlich. Für den Einsatz beim Menschen erfordert dies zusätzliche logistische und sicherheitstechnische Maßnahmen.

Bekannt ist es T-Zellen in Kultur dadurch zu vermehren, daß Kügelchen eingesetzt werden, an welchen sowohl CD28-spezifische costimulatorische mAb als auch TCR (CD3) spezifische mAb gebunden sind. Hierbei ist zunächst von Nachteil, daß zwei verschiedene Substanzen benötigt werden. Dies erfordert einen beachtlichen Aufwand bei der Herstellung unter GMP Bedingungen, welche für zur Therapie bestimmte Präparate gesetzlich vorgeschrieben sind. Weiterhin ist von Nachteil, daß jede dieser Substanzen in relativ hoher Konzentration eingesetzt werden muß, da aufgrund der gemeinsamen Immobilisierung auf einem Kügelchen nicht alle Moleküle für die notwendigerweise simultane Bindung Zielzellen allein schon aus sterischen Gründen zur Verfügung stehen.

### Technisches Problem der Erfindung.

Der Erfindung liegt daher das technische Problem zu Grunde, Mittel zur Verfügung zu stellen, mit welchen sich  
5 Blutzellen stimulieren lassen, wobei die Menge an benötigten mAbs niedriger ist als bei Einsatz der gleichen mAbs in Lösung, welche die Stimulation von der Anwesenheit bzw. der Qualität Fc-Rezeptor tragender nicht-T-Zellen unabhängig macht, und welche unter GMP Bedingungen einfacher her-  
10 stellbar sind.

### Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsbeispiele.

15

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung Mikropartikel mit einer Trägerstruktur sowie mit an die Trägerstruktur gebundenen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpern (mAb) oder einer Mimi-  
20 kryverbindung hierzu. Überraschenderweise wird für einen definierten stimulatorischen Effekt mittels solchermaßen immobilisierter mAb eine geringere Menge an mAbs benötigt bzw. wird bei gleicher Menge ein stärkerer stimulatorischer Effekt erreicht. Dies wird zudem erreicht, ohne daß  
25 ein TCR Signal benötigt wird. Die Bindung von TCR spezifischen Antikörpern oder anderen costimulatorischen Komponenten an der Trägerstruktur ist nicht erforderlich, wodurch auch sterische Probleme einer Costimulation durch immobilisierte Substanzen vermieden werden. Bei einer in  
30 vitro Stimulation von T-Zellen werden in der Zellkultur (neben dem Medium) nur zwei Komponenten benötigt, die T-Zellen und die erfindungsgemäßen Mikropartikel. Es entfällt die Notwendigkeit für "Feeder" Zellen oder die

Beschichtung von Plastikoberflächen mit Antikörperpräparaten, die die mAbs quervernetzen.

In diesem Zusammenhang ist als weiterer Vorteil von besonderer Bedeutung, daß zur Herstellung erfindungsgemäßer Mikropartikel nur ein einziger Antikörper erforderlich ist, was die Herstellung unter GMP Bedingungen erheblich vereinfacht.

10 Im Einzelnen kann die Bindung der mAb an die Trägerstruktur auf die unterschiedlichste Weise erfolgen. So ist es möglich, daß die mAb direkt und über elektrostatische Kräfte, van der Waals Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise jedoch kovalent, an die Oberfläche der Trägerstruktur gebunden sind. Die mAb können aber auch indirekt über eine vorzugsweise kovalent mit der Oberfläche der Trägerstruktur verbundenen Spacerverbindung an die Oberfläche der Trägerstruktur gebunden sein.

20 Als Spacerverbindung kommen grundsätzlich alle organischen Moleküle in Frage, welche einerseits eine mit reaktiven Gruppen der Oberfläche der Trägerstruktur reaktive Gruppe aufweisen und andererseits in der Lage sind, mAbs zu binden. Dabei kann die Bindung der mAbs über elektrostatische Kräfte, van der Waals Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalent erfolgen. Die Spacerverbindung kann insbesondere ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "organische Polymere, Peptide, Proteine, Immunglobuline, und Kombinationen solcher Substanzen". Die Spacerverbindung  
25  
30 sollte physiologisch verträglich sein.

Hinsichtlich der Trägerstruktur ist deren Zusammensetzung unkritisch, solange eine Bindung der mAb oder einer

Spacerverbindung an der Oberfläche einrichtbar ist. Es versteht sich, daß die Materialien der Trägerstruktur, jedenfalls soweit diese mit Zellen oder einer Lösung in Kontakt treten können, physiologisch verträglich sein sollten. Zweckmäßigerweise wird die Oberfläche der Trägerstruktur durch ein organisches Polymer gebildet, welches vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Polystyrol, Polyurethan, Polyester, Polyvinylpyridin, Polyvinylamin, Polyethylenimin, Chitosane, und Mischungen solcher Polymere". Das organische Polymer kann zum Zwecke der kovalenten Bindung von mAbs oder Spacerverbindungen reaktive Gruppen aufweist, welche vorzugsweise Glycidylether ist. Im Falle der Glycidylethergruppe erfolgt eine kovalente Bindung eines Proteins oder Peptids durch Reaktion primärer Amingruppen des Proteins oder Peptids mit dieser Gruppe.

Je nach eingesetztem Polymer kann es sich empfehlen, daß das organische Polymer oberflächenaktiviert ist durch Behandlung mit einem Aktivierungsreagenz, welches vorzugsweise p-Toluensulphonylchlorid ist.

Der Durchmesser der Trägerstruktur liegt zweckmäßigerweise im Bereich von 0,1 µm bis 100 µm, vorzugsweise im Bereich von 1 µm bis 20 µm, insbesondere im Bereich von 1 µm bis 10 µm. Die Partikelgröße kann beispielsweise mittels der Laserdiffraktometrie (Mastersizer x, Malvern Instruments, Herrsching) oder der Photonen Korrelations Spektroskopie (Zetasizer 4, Malvern Instruments, Herrsching) bestimmt werden. Die Oberfläche der Trägerstruktur kann das 1- bis 10-fache, vorzugsweise das 1- bis 4-fache, der geometrischen Oberfläche, angenommen als eine glatte Kugeloberfläche, betragen.

Geeignete Trägerstrukturen sind beispielsweise magnetische Beads, wie sie für die Zellseparation mittels Magneten verwendet werden, beispielsweise Dynabeads der Firma Dynal, oder auch SiO<sub>2</sub> Partikel. Weiterhin ist es möglich, 5 Trägerstrukturen zu verwenden, welche vorzugsweise biologisch abbaubar sind, wodurch die Mikropartikel einem Patienten bedenkenlos verabreicht werden können. Geeignete Polymere für solche Trägerstrukturen sind beispielsweise in den Literaturstellen WO 01/05875, Kissel et al., Advanced Drug Delivery Reviews 54: 99-134 (2002), beschrieben. Bei ersteren handelt es sich im Kern um Polyethylenimine (PEI) und Derivate hiervon. Biologisch abbaubare Polymere können auch ladungsmodifizierte Polyester, Polyvinylpyri- 15 dine oder Polyvinylamine sein.

Die Erfindung lehrt weiterhin die Verwendung von erfindungsgemäßen Mikropartikeln zur Stimulation von Blutzellen, insbesondere T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulo- 20 zyten, Monozyten und/oder Thrombozyten. Dabei kann die Stimulation in vitro oder in vivo (letzteres insbesondere im Falle der CD28-negativen Zellen) erfolgen. Im Falle der T-Lymphozyten werden zumindest mehrere Untergruppen stimuliert. Daher ist auch die Verwendung zur Herstellung einer 25 pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen mit reduzierten Blutzellzahlen, insbesondere reduzierten T-Lymphozytenzahlen, von immunpathologischen Erkrankungen (Beispiele s.u.) oder zur Potenzierung der Immunreaktion bei Impfungen umfaßt, wobei einem Patienten 30 eine Blutprobe entnommen wird, wobei optional aus der Blutprobe die Blutzellen isoliert werden, wobei die Blutzellen in vitro unter Zugabe einer physiologisch wirksamen Dosis an Mikropartikeln kultiviert werden, und wobei die

so erhaltenen Blutzellen optional galenisch zur Injektion oder Infusion hergerichtet werden. Ebenso ist die Verwendung erfindungsgemäßer Mikropartikel zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen mit reduzierten Blutzellzahlen, von immunpathologischen Erkrankungen (beispielsweise rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, Insulinpflichtiger Diabetes, Multiple Sklerose oder das Guillain-Barré-Syndrom) oder zur Potenzierung der Immunreaktion bei Impfun-  
5 gen umfaßt, wobei die Mikropartikel zur Injektion oder Infusion galenisch hergerichtet sind. Die galenische Her- richtung zur Injektion kann für die i.m., i.p. oder i.v. Injektion sein.

15 Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Mikropartikeln mit den folgenden Verfahrensschritten: a) es werden Mikropartikel mit einer aus einem oder mehreren verschiedenen organischen Polymeren gebildeten Oberfläche hergestellt, b) optional  
20 wird die Oberfläche aktiviert, c) die so erhaltenen Mikropartikel werden mit einer Lösung enthaltend CD28-spezifische superagonistische mAb inkubiert, wobei die mAb vorzugsweise kovalent an die Oberfläche gebunden werden, oder c') die so erhaltenen Mikropartikel werden  
25 zunächst mit einer Lösung enthaltend eine Spacerverbindung inkubiert, wobei die Spacerverbindung vorzugsweise kovalent an die Oberfläche gebunden wird, optional erfolgt danach eine Waschverfahrensstufe, und anschließend werden die Mikropartikel mit der gebundenen Spacerverbindung mit  
30 einer Lösung enthaltend CD28-spezifische superagonistische mAb inkubiert, wobei die mAb an die Spacerverbindung kovalent oder nicht-kovalent gebunden werden, und e) die so erhaltenen CD28-spezifische superagonistische mAb

tragenden Mikropartikel werden aus der Lösung abgetrennt und optional einer Waschverfahrensstufe unterworfen.

Die Erfindung betrifft schließlich auch Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung der beschriebenen Erkrankungen, wobei einem Patienten entweder die erfindungsgemäßen Mikropartikel, galenisch geeignet hergerichtet, verabreicht werden, oder wobei vorzugsweise autologe Zellen in vitro mittels erfindungsgemäßer Mikropartikel stimuliert und nach der Stimulation ohne oder mit den Mikropartikeln, galenisch geeignet hergerichtet, implantiert werden.

Erläuterungen zu den Mikropartikeln gelten sinngemäß auch für die erfindungsgemäßen Verwendungen und Verfahren.

15

#### Definitionen.

Die Aminosäuresequenz von Human CD28 ist unter der Accession No. NM\_006139 bekannt.

Superagonistische CD28 spezifische mAb sind beispielsweise aus Hybridomzellen erhältlich, die unter den Hinterlegungsnummern DSM ACC2530 und DSM ACC2531 hinterlegt sind. Humanisierte mAb entsprechend DSM ACC2530 weisen Sequenzen der leichten Kette sowie der schweren Kette gemäß den SEQ.-ID 1 und 2 auf.

Mit Stimulierung bzw. Aktivierung von Blutzellen, insbesondere T-Lymphozyten, ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in

30

die Zellteilung (Proliferation) auf einen äußeren Reiz hin bezeichnet.

Mehrere Untergruppen der T-Zellen meint zumindest die 5 Untergruppen der CD4 und CD8 T-Zellen. Zu den CD4 T-Zellen zählen neben den "normalen" CD25-negativen T-Zellen auch die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, welche auch als regulatorische T-Zellen bekannt sind. Nach Befunden in Tiermodellen geht der derzeitige Stand der Technik 10 davon aus, daß letztere bei zahlreichen autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Multiplen Sklerose, Guillian-Barré-Syndrom, demyelinisierender Polyneuropathie, etc, eine Rolle spielen. Ein nützlicher Marker für regulatorische T-Zellen 15 ist die starke Expression von CTLA-4 (CD152), das von nicht-regulatorischen T-Zellen nur nach Aktivierung und dann auch nur in geringem Maße exprimiert wird.

Der Begriff der mAb umfaßt neben Strukturen des üblichen Fab/Fc Aufbaus auch Strukturen, die ausschließlich aus dem Fab-Fragment bestehen. Es ist auch möglich, lediglich die variable Region zu nutzen, wobei das Fragment der schweren Ketten mit dem Fragment der leichten Kette auf geeignete Weise, beispielsweise 25 auch mittels synthetischer Brückenmoleküle, so verbunden ist, daß die Bindungsregionen der Ketten die Antikörperbindungsstelle bilden. Der Begriff der Antikörper umfaßt auch (vollständige) chimäre sowie humanisierte Antikörper.

30

Der Begriff der mAb umfaßt weiterhin zu den eigentlichen mAbs analoge Peptide oder Proteine. Ein analoges Peptid oder Protein ist ein Peptid oder Protein,

- dessen Aminosäuresequenz von jener des Peptids oder Proteins, zu welchem es analog ist, abweicht, jedoch einen definierten Bindungspartner des eigentlichen mAb mit zumindest gleicher Affinität bindet. Abweichungen  
5 in der Sequenz können Deletionen, Substitutionen, Insertionen und Elongationen sein. Ein analoges Peptid oder Protein wird in der Regel eine dem Peptid oder Protein sehr ähnliche Tertiär(teil)struktur und/oder Exposition im Rahmen eines (Zelloberflächen-) Proteins  
10 aufweisen und braucht ansonsten nur in dem dem unmittelbaren Bindungsbereich des Peptids oder Proteins analogen Bereich eine Bindungsstelle für den definierten Bindungspartner aufzuweisen bzw. diese bilden.
- 15 Eine Mimikryverbindung eines mAb ist eine natürliche oder synthetische chemische Struktur, die sich in einem Bindungsassay wie ein definierter mAb verhält, welchen die Mimikryverbindung mimikriert.
- 20 Superagonistische Modulation der Proliferation von Blutzellen, insbesondere T-Zellen meint, daß keine Costimulation, i.e. kein weiteres Bindungsereignis neben einer (initialen) Bindung eines mAb oder einer Mimikryverbindung an CD28 zur Stimulation oder Inhibierung  
25 der Proliferation erforderlich ist.

Der Begriff der Behandlung umfaßt auch den Begriff der Prophylaxe.

- 30 Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: direkte Koppelung von mAb an magnetische Beads.

Eingesetzt werden oberflächenaktivierte magnetische Beads  
5 des Firma Dynal (Dynabeads). Die Oberfläche der Beads ist hydrophob und trägt Glycidylethergruppen. Eine kovalente Bindung von Antikörpern erfolgt durch Reaktion primärer Amingruppen der Antikörper mit den Glycidylgruppen. Die Beads sind einheitlich geformte, superparamagnetische  
10 Kügelchen mit einem Kern aus  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , welcher mit einer Polystyrolhülle überzogen ist. Der mittlere Durchmesser beträgt 4,5  $\mu\text{m}$ . Die Dichte beträgt ca. 1,5  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Die Oberfläche beträgt 1 bis 4  $\text{m}^2/\text{g}$  Beads. Die geometrische Oberfläche beträgt  $6 \times 10^{-4} \text{m}^2/10^7$  Dynabeads (ca.  
15 0,9  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Die magnetischen Eigenschaften sind im Rahmen der Erfindung irrelevant, helfen allerdings bei der Handhabung im Rahmen der Präparation.

Die gewünschte Anzahl Beads wird der gelieferten  
20 Suspension nach gründlicher Mischung der Suspension (Vortex, 5 min.) entnommen. Das Gefäß mit den Beads wird in eine magnetische Halterung eingesetzt (30-60 s), wodurch die Beads pelletiert werden. Der Überstand wird abgenommen und Kopplungspuffer, in welchem die Bindung der  
25 Antikörper an die Beads erfolgen soll (0,1 M  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , pH 8,5, eingestellt mit NaOH), wird zugesetzt. Die Beads werden gründlich resuspendiert (Vortex, mindestens 2 min.) und auf diese Weise gewaschen. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal durchgeführt.

30

Für die Kopplung des Antikörpers werden die Beads in frischem Kopplungspuffer zusammen mit dem CD28 spezifischen superagonistischen Antikörper (huIgG-5.11,

voll humanisierter mAb des IgG 4 Isotyps, gentechnologisch abgeleitet von einem mAb aus DSM ACC2530) sorgfältig resuspendiert (Vortex, 30-60 s). Die Konzentration der Beads beträgt  $4 \times 10^8$ /ml. Je  $10^7$  Beads werden 5  $\mu$ g gereinigter mAb eingesetzt. Das Inkubationsgefäß mit dem Ansatz wird an einem Rotator befestigt, durch langsame Rotation des Inkubationsgefäßes wird die Sedimentation der Beads und damit eine Entmischung des Reaktionsansatzes verhindert. Die Inkubation erfolgt 20-24 h zwischen 4°C und 37°C, beispielsweise 20°C.

Nach der Inkubation werden die Beads mit Hilfe der magnetischen Halterung pelletiert, der Überstand wird abgenommen und für eine Proteingehaltmessung aufbewahrt. Die Beads werden in Waschpuffer (PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,1% BSA) resuspendiert. Die Suspension wird auf dem Rotator bei langsamer Drehung 5 min. bei 4°C gewaschen. Dieser Waschschrift wird insgesamt dreimal mit jeweils frischem Waschpuffer durchgeführt. Nach Abschluß der Waschschrift werden die Beads in Waschpuffer resuspendiert und sind verwendungsfähig. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Eine Messung des Proteingehaltes der Überstandes aus der Koppelung ergibt einen Anteil von ca. 50% der eingesetzten Menge, so daß maximal 50% der eingesetzten Menge als gekoppelt angenommen werden können. Hieraus errechnet sich eine Mindestanzahl Beads von  $4 \times 10^6$ / $\mu$ g gekoppelter mAb, oder 2,5  $\mu$ g mAb/ $10^7$  Beads.

Beispiel 2: indirekte Koppelung von mAb an magnetische Beads.

Es wird grundsätzlich analog dem Beispiel 1 vorgegangen,  
5 nur daß anti-Maus Ig Dynabeads verwendet werden. Hierbei handelt es sich um Beads, an deren Oberfläche Schaf-anti-Maus Immunglobulin kovalent gekoppelt ist. Als Kopplungspuffer wird Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) eingesetzt. Als mAb wurden Maus  
10 anti-human CD28 spezifische superagonistische mAb eingesetzt, welche erhältlich sind aus DSM ACC 2530. Deren Spezifität entspricht vollumfänglich jener der in Beispiel 1 eingesetzten mAb, da Übereinstimmung in den Antigen-Bindungsbereichen besteht. An das Immunglobulin  
15 bindet der eingesetzte mAb nicht-kovalent gemäß der Figur 1.

Beispiel 3: in vitro Stimulation in einem PBMC System.

20 Pro Napf einer 96 Lochplatte wurden  $2 \times 10^5$  PBMC (periphere Blut mononukleäre Zellen, i.e. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten) in 0,2 ml RPMI 1640 Kulturmedium mit 10% autologem Serum kultiviert. Von Tag 2  
25 auf Tag 3 wurde ein 16-stündiger Puls mit 1  $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin durchgeführt, worauf das in die DNA eingebaute Thymidin als Nachweis der Proliferation gemessen wurde. Die Ergebnisse der Figur 2 vergleichen die Fähigkeit des humanisierten superagonistischen mAb hN4 5.11A1,  
30 ungetrennte menschliche PBMC (also eine Mischung aus T-Lymphozyten und Fc Rezeptor tragenden nicht-T-Lymphozyten) in löslicher gegenüber bead-gekoppelter Form zu stimulieren. Dabei ist auf der Abszisse die jeweils

tatsächlich in das System eingebrachte Antikörpermengen (in löslicher Form oder gebunden an Beads) angegeben. Die Ordinate zeigt die eingebaute Radioaktivität als Maß der Proliferation. Dieses repräsentative Experiment zeigt eindeutig, daß der an Beads gekoppelte Antikörper erstens im Optimum eine weitaus stärkere Proliferation induziert als der nur löslich zugegebene, und zweitens, daß die spezifische Aktivität des Antikörpers im Sinne der Proliferationsinduktion bei Bindung an Beads etwa 10-fach höher liegt als bei Zugabe des isolierten Antikörpers.

Beispiel 4: in vitro Stimulation von isolierten T-Lymphozyten.

15

Unter ansonsten gleichen Kultivierungs- und Messbedingungen wie in Beispiel 3 wurden pro Napf  $2 \times 10^5$  gereinigte T-Lymphozyten eingesetzt (gewonnen mittels Nylonwollfiltration). In Figur 3 ist ein Vergleich bei Einsatz von Mikropartikeln aus Beispiel 1 mit einem Einsatz der in Beispiel 1 eingesetzten, jedoch nicht mit mAb gekoppelten Mikropartikeln dargestellt. Zusätzlich wird der stimulierende Effekt mit löslichen zugesetzten mAbs in An- und Abwesenheit eines an die Plastikoberfläche gekoppelten Sekundärantikörpers (Esel anti-human Ig) verglichen. Man erkennt, dass unkonjugierte Mikropartikel keine Proliferation auslösen, während die mAb tragenden Mikropartikel eine sehr starke Aktivität zeigen. Diese ist um ein Vielfaches höher als die Aktivität, welche durch lösliche mAb in An- oder Abwesenheit des immobilisierten Sekundärantikörpers erreicht wird. Die im Vergleich zu ungetrennten PBMC (Figur 2) sehr geringe Stimulation durch löslich zugesetzten Antikörper ist erwartet, da Zellen mit

Rezeptoren für das Fc Stück des Antikörpers (FCR) fehlen. Die Anwesenheit des immobilisierten Sekundärreagenzes führt zu einer leichten Steigerung der Reaktivität auf löslich zugesetzten Antikörper. Die Beads übernehmen die Funktion Fc Rezeptor positiver Zellen jedoch um ein Vielfaches effizienter.

#### Beispiel 5: Stimulierbare T-Zell Untergruppen.

10

Gereinigte T-Lymphozyten wurden entsprechend dem Beispiel 4 kultiviert, wobei Mikropartikel gemäß Beispiel 2 eingesetzt wurden. Nach 3-tägiger Kultur wurden die Zellen im FACS auf die Expression des nukleären Proliferationsmarkers Ki67 nach intrazellulärer Färbung untersucht. Dabei wurden selektiv die CD4 bzw. die CD8 T-Zellen durch elektronisches Gating nach gleichzeitiger Anfärbung mit einem CD4 oder CD8 spezifischen Antikörper analysiert. Die gesetzten Fenster sind in den Figuren 4a (CD4<sup>+</sup>-Zellen) und 4b (CD8<sup>+</sup>-Zellen) dargestellt. PE steht für den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin. In die Histogramme der Figuren 4c bis 4f gingen jeweils nur die Zellen aus dem jeweils eingekastelten Bereich ein (Figuren 4c und 4e: CD4<sup>+</sup>-Zellen; Figuren 4d und 4f: CD8<sup>+</sup>-Zellen). In den Histogrammen erfolgte eine Kontrollfärbung mit einem irrelevanten Antikörper (offene Kurven) sowie die Ki67 Färbung. FITC steht für den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiozyanat. Eine vergleichende Betrachtung der Figuren 4c und 4d einerseits sowie der Figuren 4e und 4f andererseits zeigt, daß ohne Stimulation Kontroll- und Ki67 Histogramme sich kaum voneinander absetzen. Dagegen sind bei Stimulation mit den erfindungsgemäßen Mikropartikeln praktisch alle CD4 T-Zellen und die

Mehrheit der CD8 T-Zellen Ki67-positiv und proliferieren folglich. Die Histogramme der Figuren 4d und 4f sind flacher als jene der Figuren 4c und 4e, weil weniger CD8 als CD4 T-Zellen vorhanden sind.

5

#### Beispiel 6: Stimulation regulatorischer T-Zellen.

Es wurden menschliche CD4 T-Zellen durch  
10 Nylonwoll-Filtration und immun-magnetische Depletion aller anderen PBMC-Populationen gereinigt. Hierauf wurden die erhaltenen CD4 T-Zellen in CD25 positive und CD25 negative Fraktionen aufgetrennt mittels der magnetischen  
Zellsortierung (System MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch  
15 Gladbach, Deutschland). In Figur 5a ist die Histogrammform die CD25 Expression der beiden gereinigten Populationen von CD4 T-Zellen dargestellt. Die CD25 Expression wird durch die Rechtsverschiebung der ausgefüllten  
Verteilungskurve der Fluoreszenz (CyChrome-gekoppelte CD25  
20 spezifische mAb) gegenüber der leeren Kurve für CD25-negative Zellen ersichtlich.

Die wie vorstehend erhaltenen CD4 T-Zellen wurden 3 Tage mit Mikropartikeln gemäß Beispiel 2 stimuliert. Dann wurde  
25 durch intrazelluläre Färbung die Expression von Ki67 (Proliferation) und CTLA-4 (starke Expression ist indikativ für regulatorische T-Zellen) analysiert. Die Figuren 5b und 5d zeigen die Ergebnisse für CD25-negative T-Zellen, wobei die offenen Kurven wiederum mit einem  
30 irrelevanten mAb zu Kontrollzwecken erhalten wurden. Figur 5b belegt, daß die CD25<sup>-</sup> Zellen proliferieren. Nur ein kleiner Teil der CD25<sup>-</sup> Zellen exprimieren CTLA-4, wie aus der Figur 5d ersichtlich. Figur 5c zeigt, daß auch die

22

CD25<sup>+</sup> Zellen proliferieren. Figur 5e belegt, daß die Mehrheit der CD25<sup>+</sup> Zellen stark CTLA-4 exprimiert. Im Ergebnis ist gezeigt, daß nicht nur CD25<sup>-</sup> T-Zellen, sondern insbesondere auch CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit den erfindungsgemäßen 5 Mikropartikeln stimulierbar sind.

10

15

20

25

30

## Patentansprüche:

1. Mikropartikel mit einer Trägerstruktur sowie mit an die Trägerstruktur gebundenen CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpern (mAb) oder einer Mimi-  
5 kryverbindung hierzu.
2. Mikropartikel nach Anspruch 1, wobei die mAb direkt und  
10 vorzugsweise kovalent an die Oberfläche der Trägerstruktur gebunden sind.
3. Mikropartikel nach Anspruch 1, wobei die mAb indirekt  
15 über eine vorzugsweise kovalent mit der Oberfläche der Trägerstruktur verbundene Spacerverbindung an die Oberfläche der Trägerstruktur gebunden sind.
- 20 4. Mikropartikel nach Anspruch 3, wobei die Spacerverbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "organische Polymere, Peptide, Proteine, und Kombinationen solcher Substanzen".
- 25 5. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Oberfläche der Trägerstruktur durch ein organisches Polymer gebildet wird, welches vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Polystyrol, Polyurethan, Polyester, Polyvinylpyridin, Polyvinylamin, Polyethylenimin, Chitosane, und Mischungen solcher Polymere".  
30

6. Mikropartikel nach Anspruch 5, wobei das organische Polymer reaktive Gruppen aufweist, welche beispielsweise Glycidylether ist.

5

7. Mikropartikel nach Anspruch 5 oder 6, wobei das organische Polymer oberflächenaktiviert ist durch Behandlung mit einem Aktivierungsreagenz, welches vorzugsweise p-Toluensulphonylchlorid ist.

10

8. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Durchmesser der Trägerstruktur im Bereich von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise im Bereich von 1  $\mu\text{m}$  bis 20  $\mu\text{m}$ , insbesondere im Bereich von 1  $\mu\text{m}$  bis 10  $\mu\text{m}$ , liegt.

15

9. Mikropartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Oberfläche der Trägerstruktur (gemessen mittels der BET-Methode) das 1- bis 10-fache, vorzugsweise das 1- bis 4-fache, der geometrischen Oberfläche, angenommen als eine glatte Kugeloberfläche, beträgt.

20

10. Verwendung von Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Stimulation von Blutzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und/oder Thrombozyten.

25

30

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen mit reduzierten Blutzellzahlen,

insbesondere reduzierten T-Lymphozytenzahlen, oder von immunpathologischen Erkrankungen oder zur Potenzierung der Immunreaktion bei Impfungen, wobei einem Patienten eine Blutprobe entnommen wird, wobei optional aus der Blutprobe die Blutzellen isoliert werden, wobei die Blutzellen in vitro unter Zugabe einer physiologisch wirksamen Dosis an Mikropartikeln kultiviert werden, und wobei die so erhaltenen Blutzellen optional galenisch zur Injektion oder Infusion hergerichtet werden.

12. Verwendung nach Anspruch 10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen mit reduzierten Blutzellzahlen oder von immunpathologischen Erkrankungen oder zur Potenzierung der Immunreaktion bei Impfungen, wobei die Mikropartikel galenisch vorzugsweise zur Injektion oder Infusion hergerichtet werden.

20

13. Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln nach einem der Ansprüche 1 bis 9, mit den folgenden Verfahrensschritten:

25

a) es werden Mikropartikel mit einer aus einem oder mehreren verschiedenen organischen Polymeren gebildeten Oberfläche hergestellt,

30

b) optional wird die Oberfläche aktiviert,

c) die so erhaltenen Mikropartikel werden mit einer Lösung enthaltend CD28-spezifische superagonistische

mAb inkubiert, wobei die mAb vorzugsweise kovalent an die Oberfläche gebunden werden, oder

- 5 c') die so erhaltenen Mikropartikel werden zunächst mit einer Lösung enthaltend eine Spacerverbindung inkubiert, wobei die Spacerverbindung vorzugsweise kovalent an die Oberfläche gebunden wird, optional erfolgt danach eine Waschverfahrensstufe, und anschließend werden die Mikropartikel mit der gebundenen Spacerverbindung mit einer Lösung enthaltend  
10 CD28-spezifische superagonistische mAb inkubiert, wobei die mAb an die Spacerverbindung kovalent oder nicht-kovalent gebunden werden, und
- 15 e) die so erhaltenen CD28-spezifische superagonistische mAb tragenden Mikropartikel werden aus der Lösung abgetrennt und optional einer Waschverfahrensstufe unterworfen.

20

25

30

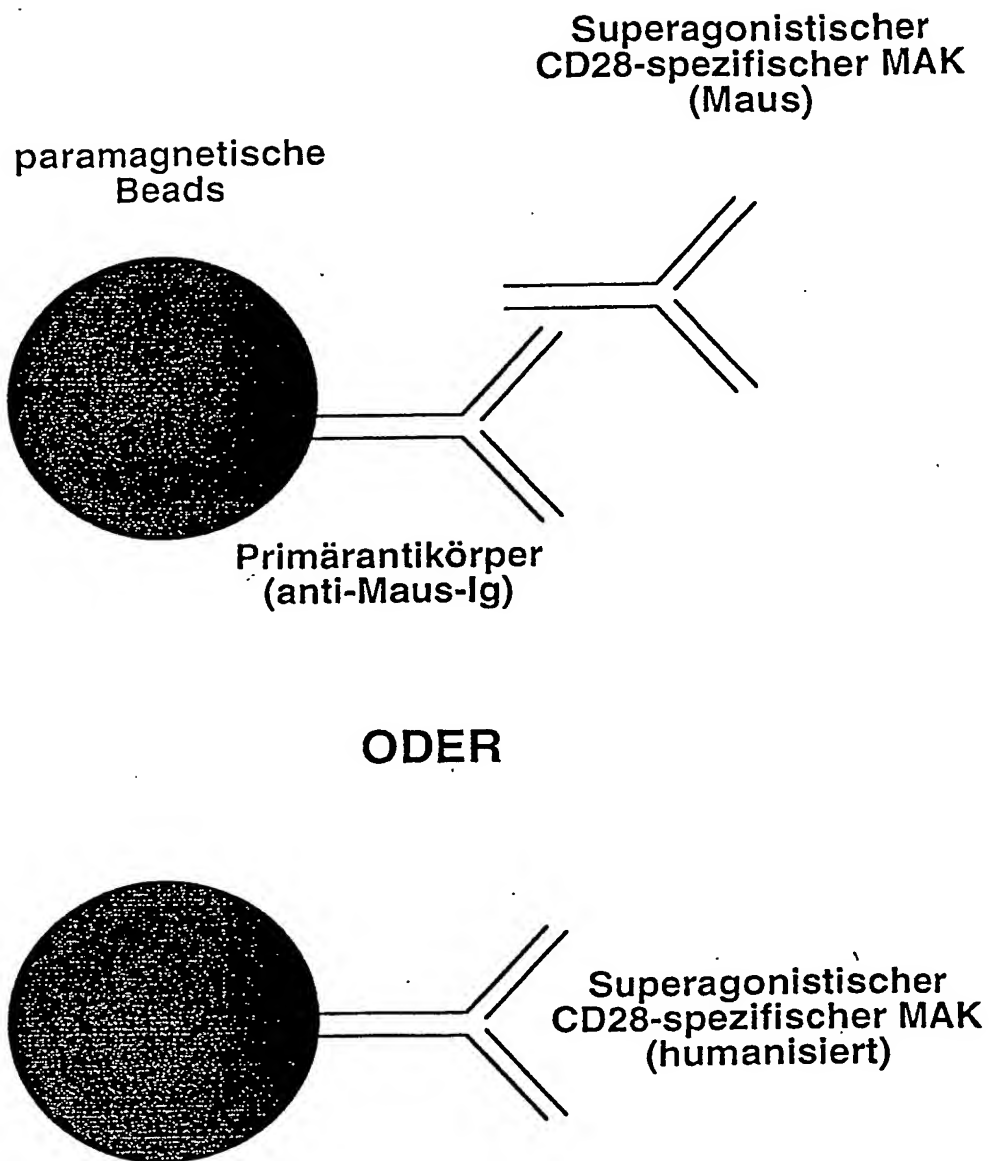


Fig. 1

## Proliferationstest - PBMC

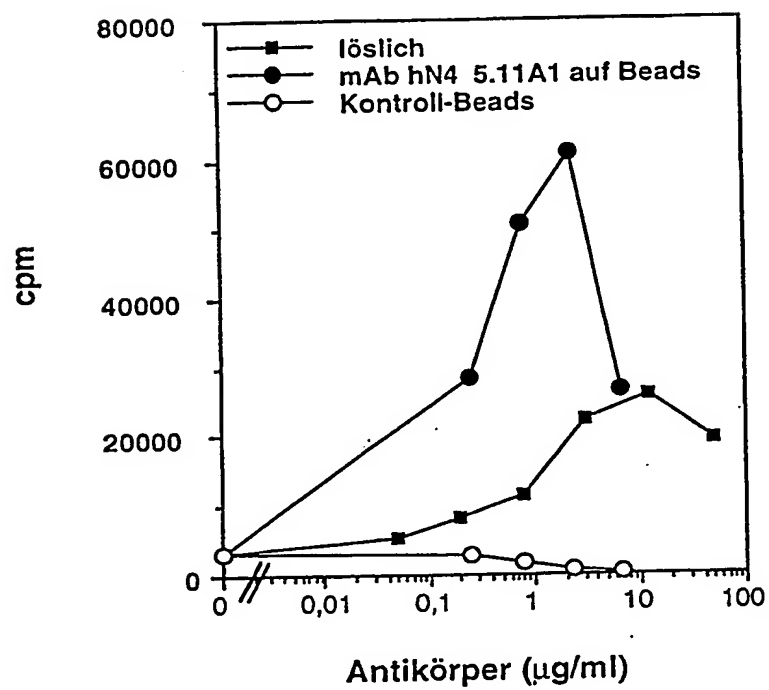


Fig. 2

### Proliferationstest - gereinigte T Zellen

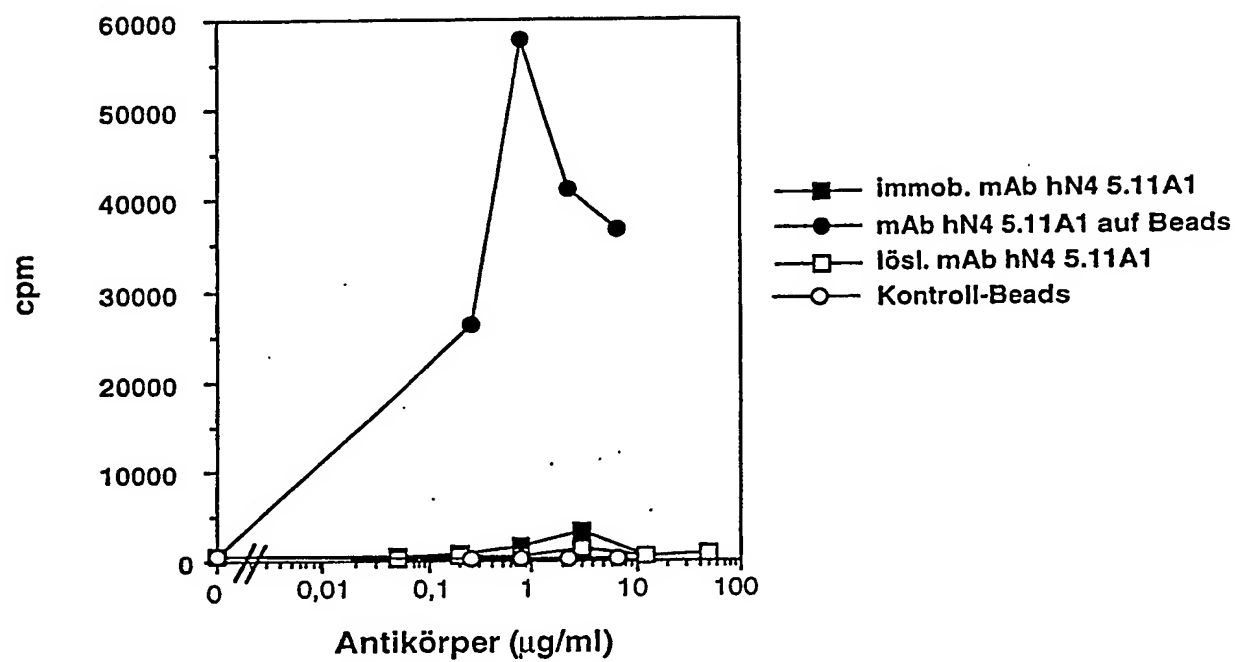


Fig. 3

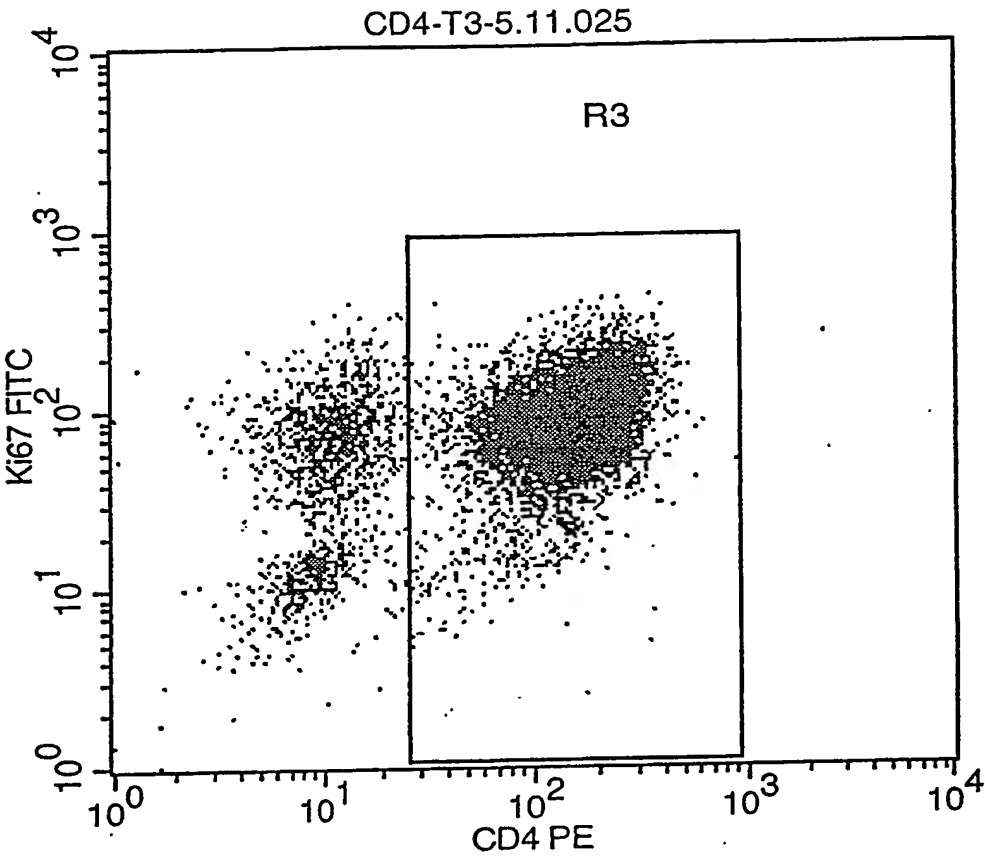


Fig. 4a

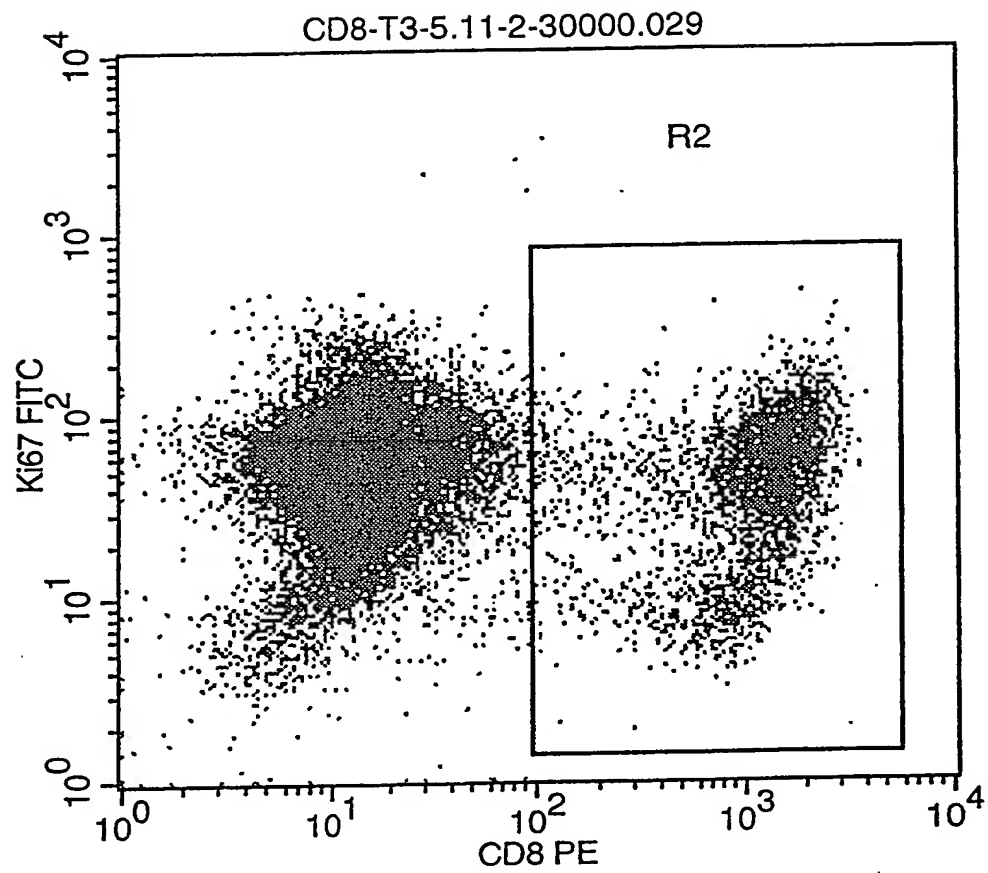


Fig. 4b

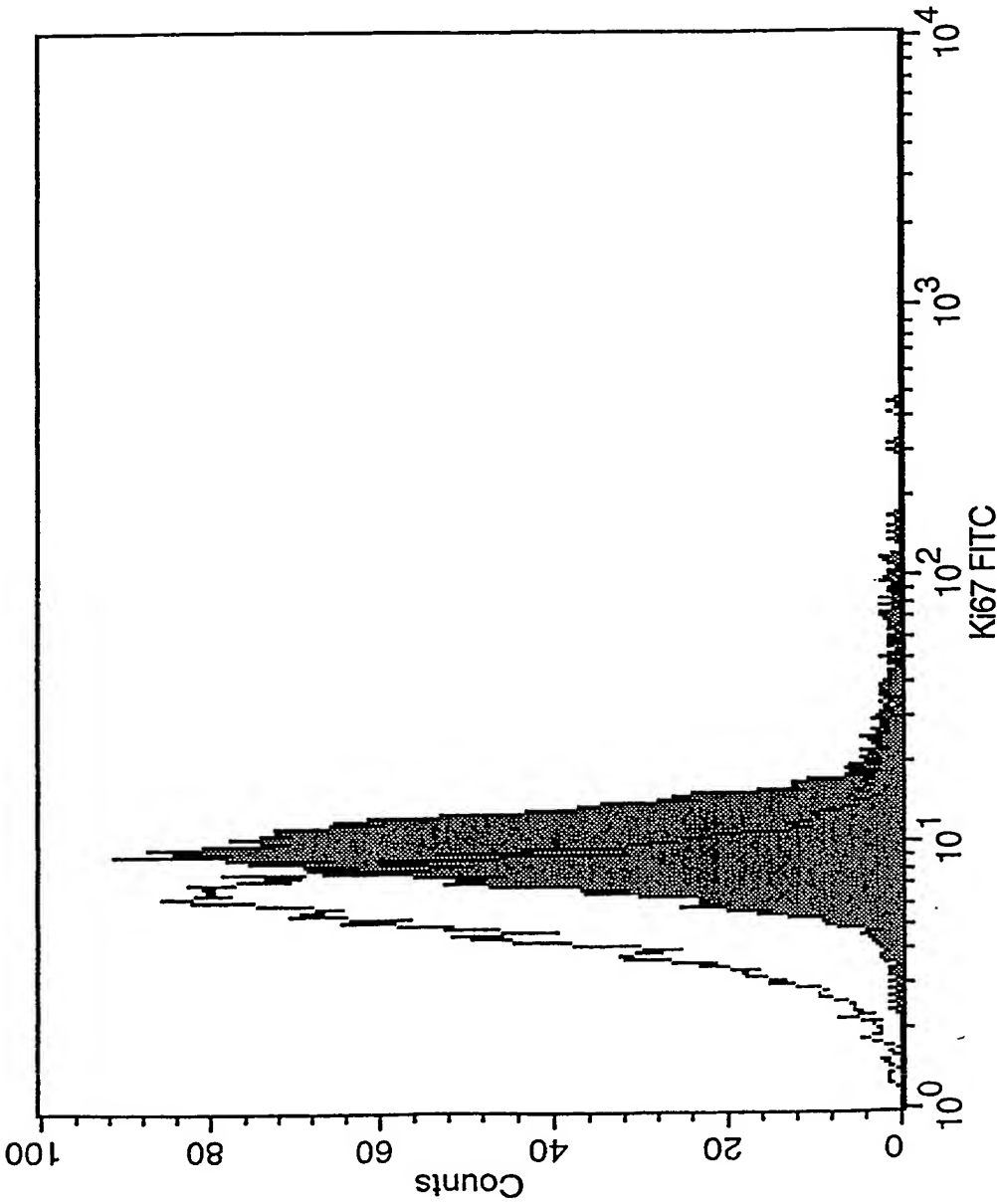


Fig. 4c

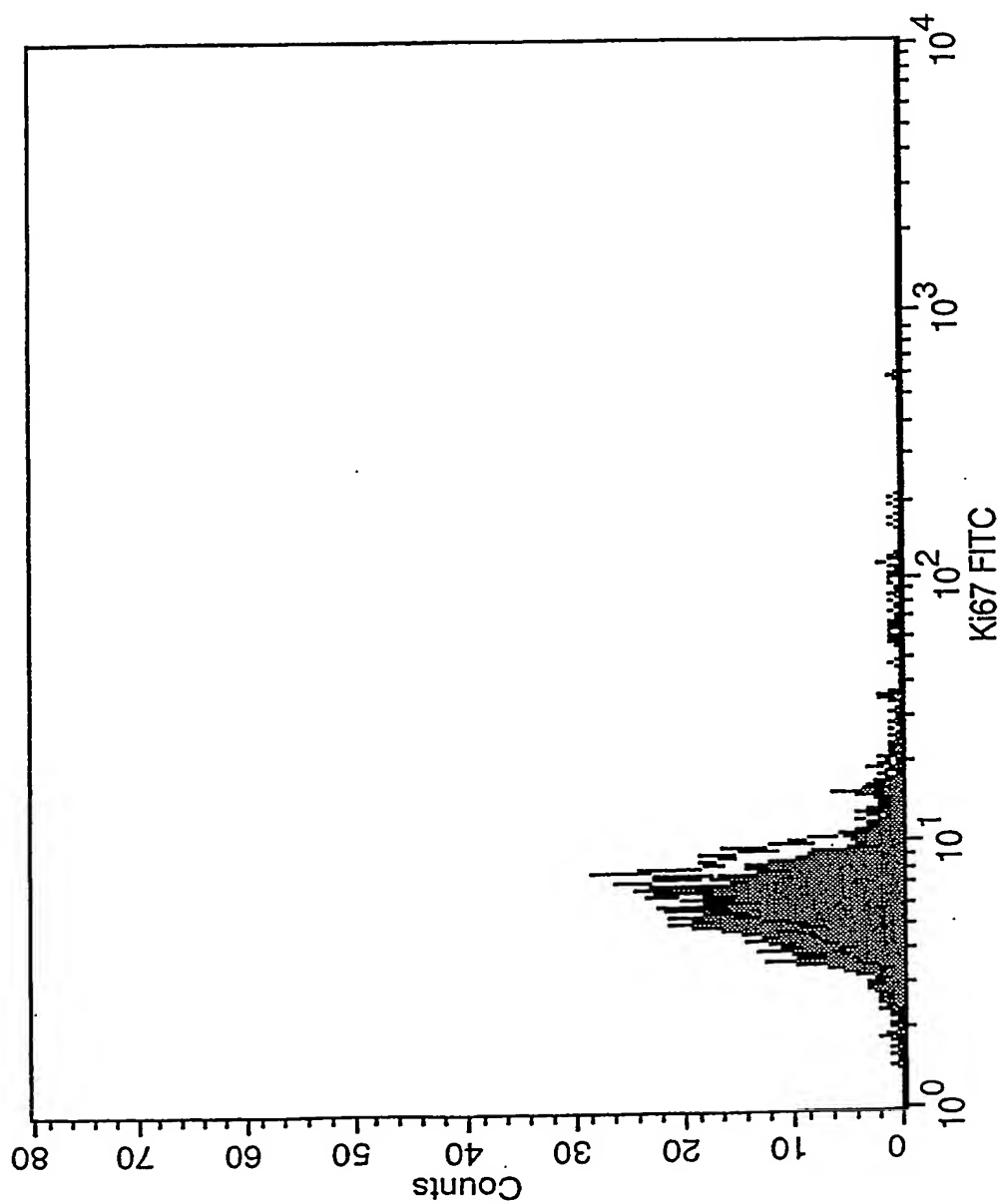


Fig. 4d

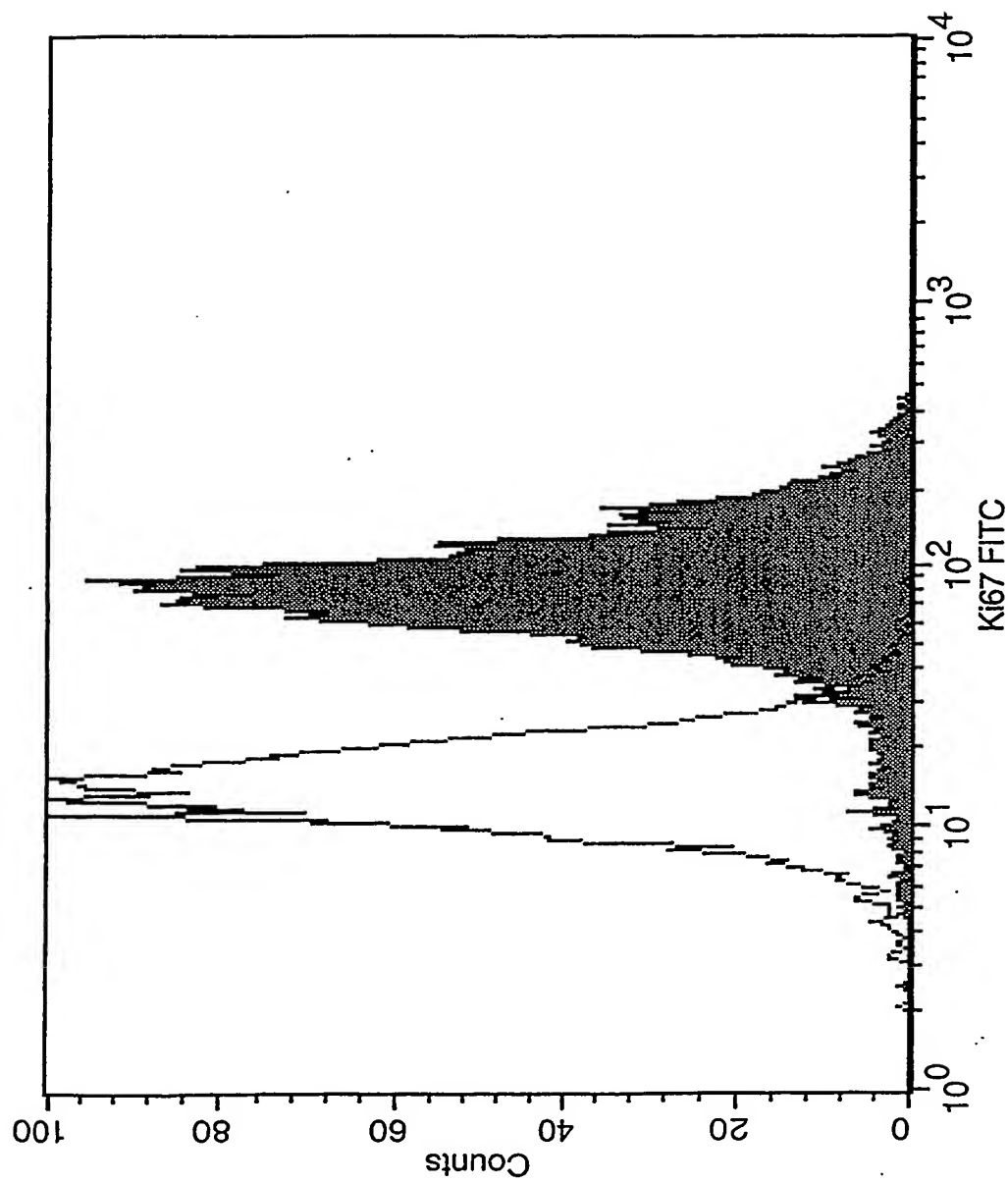


Fig. 4e

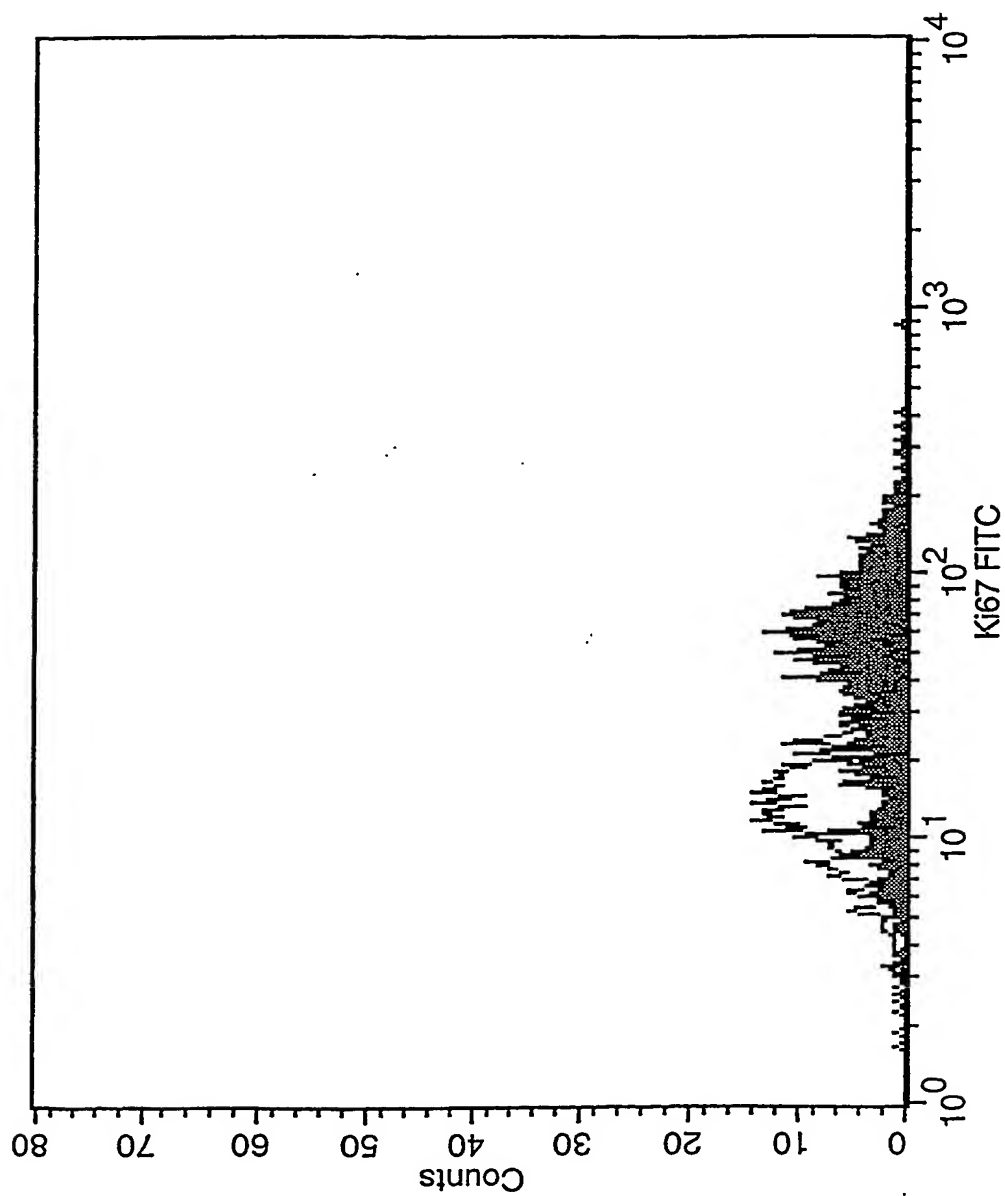


Fig. 4f

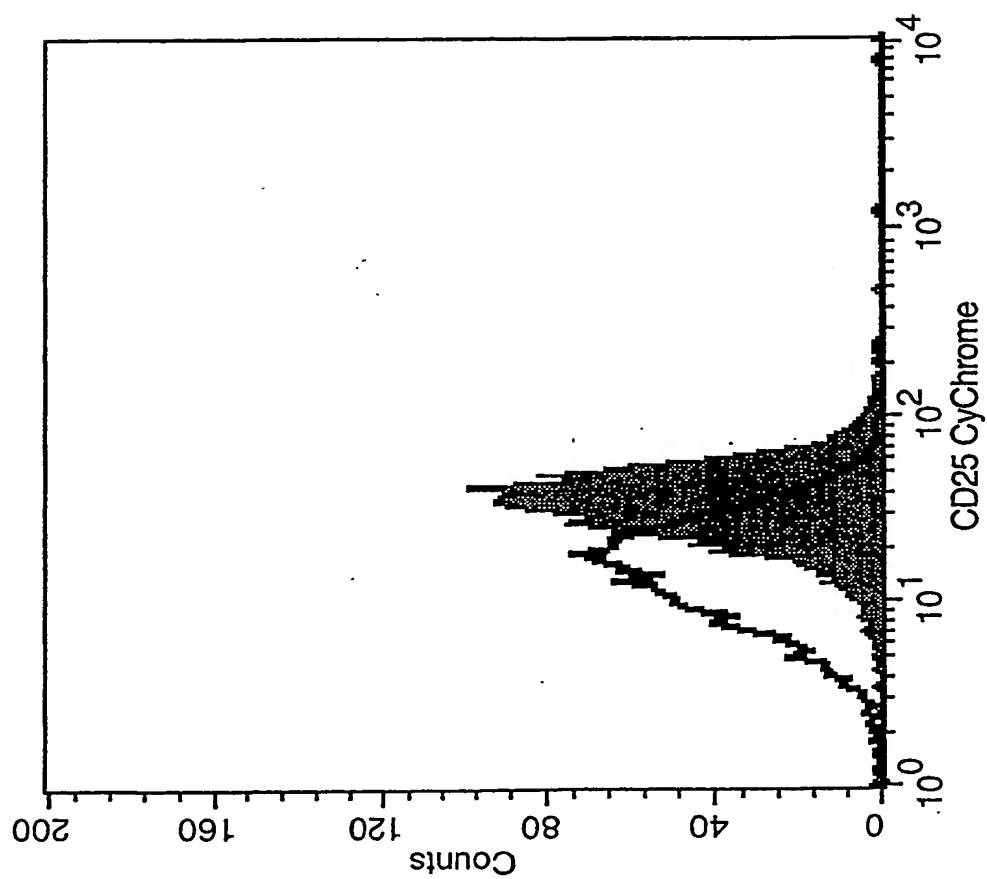


Fig. 5a

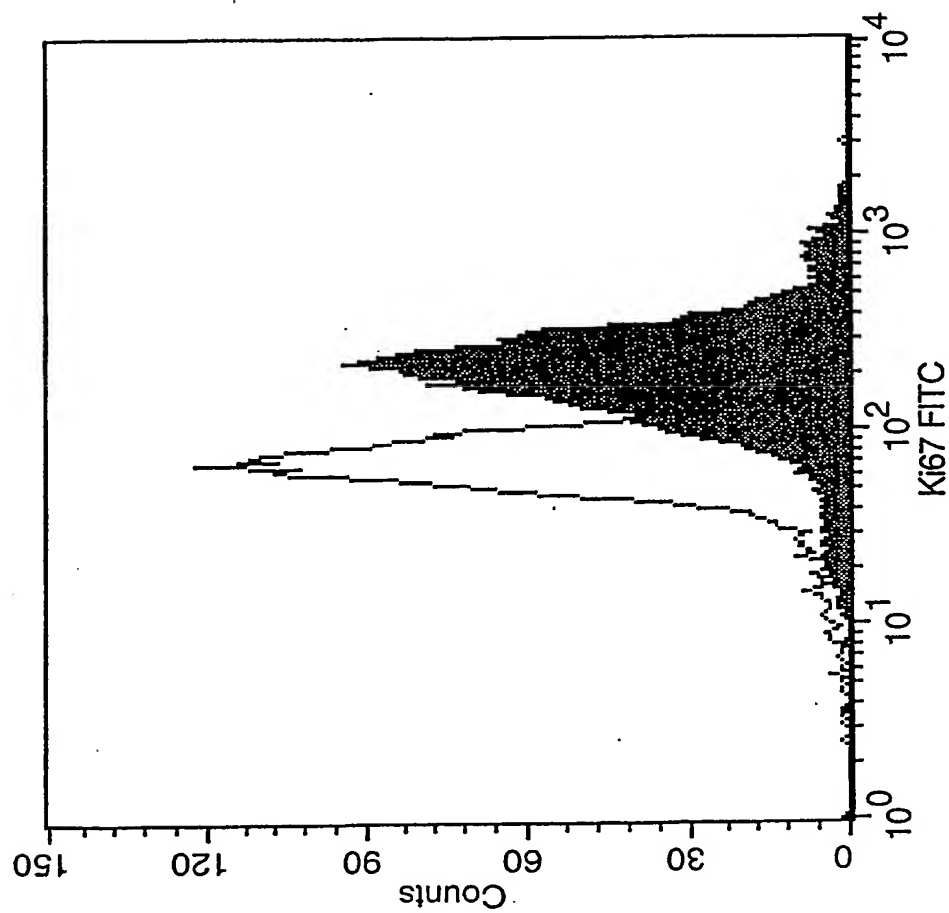


Fig. 5b

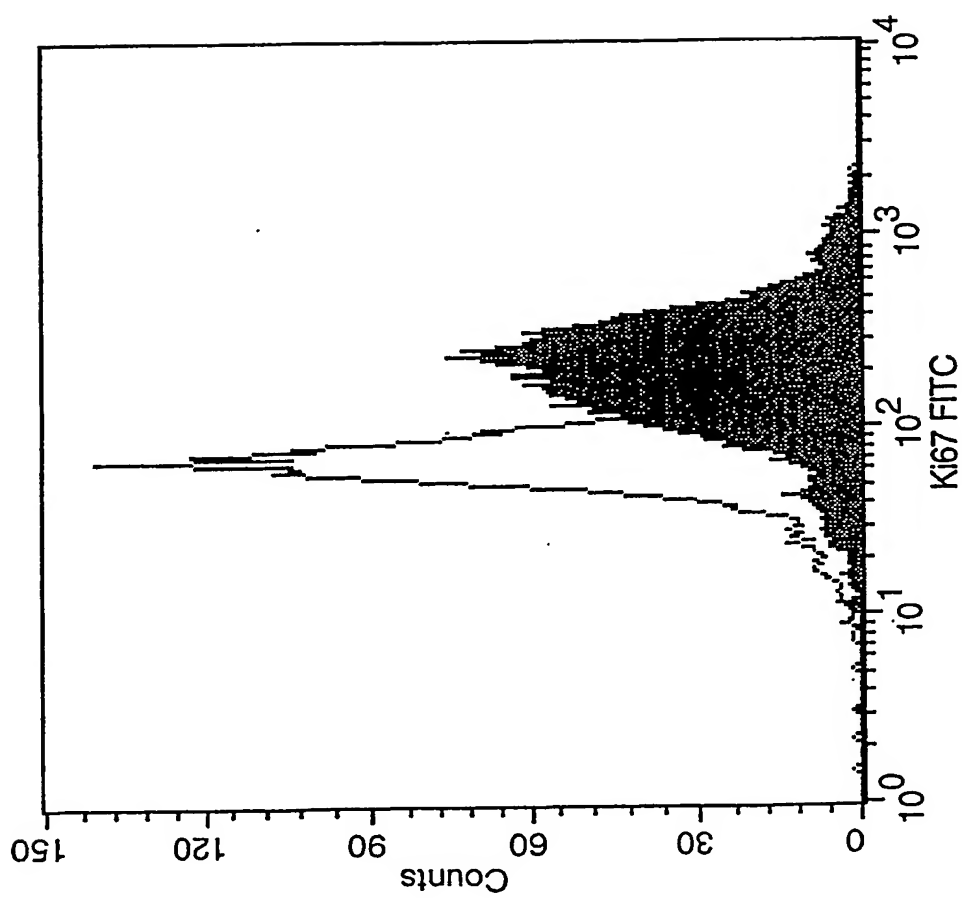


Fig. 5c

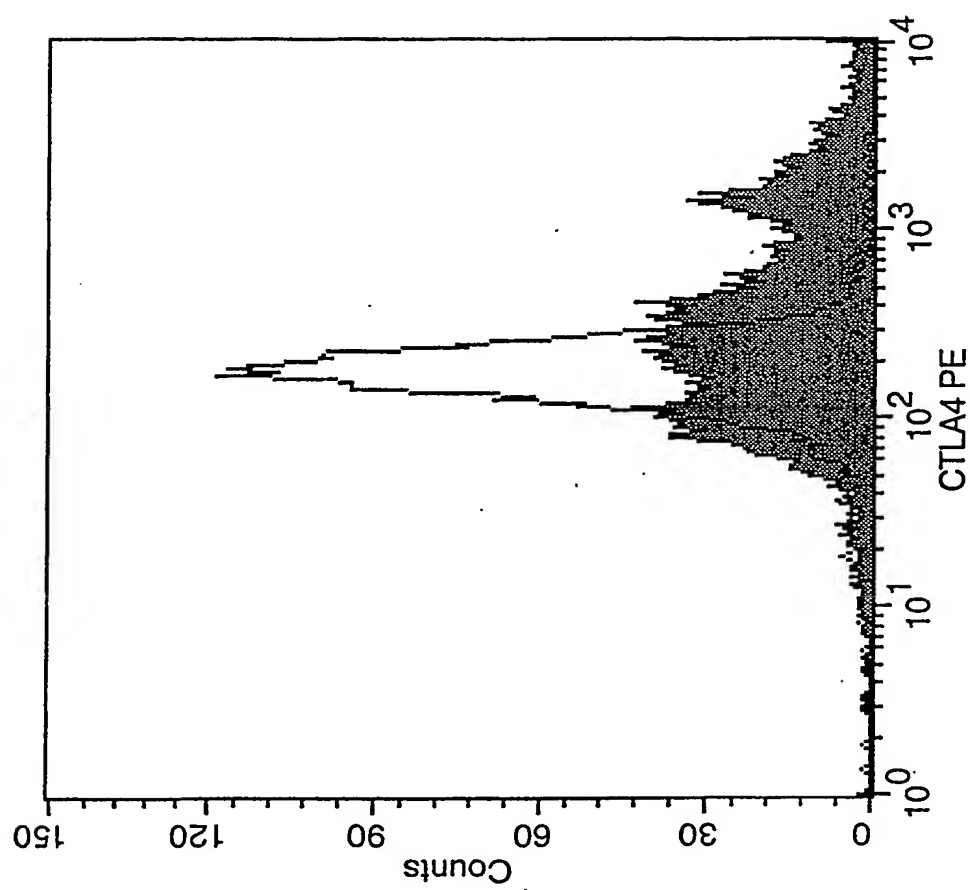


Fig. 5d

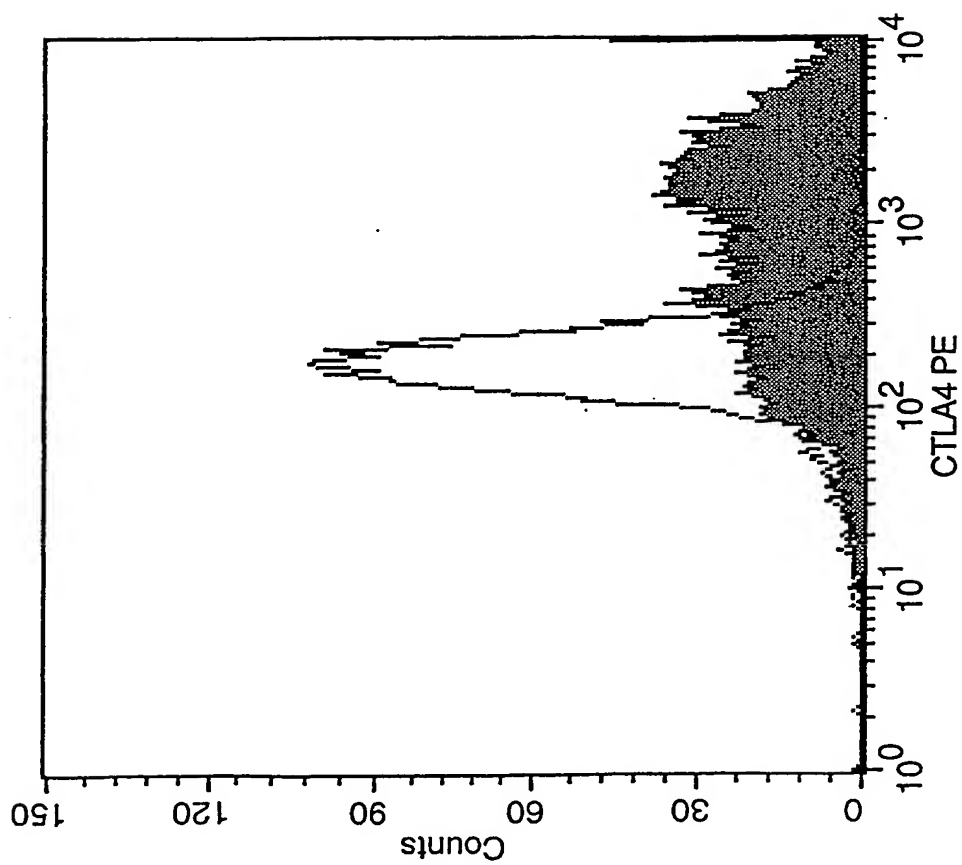


Fig. 5e

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/D 8/01825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K39/44 A61K9/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/058019 A1 (BONYHADI MARK ET AL) 16 May 2002 (2002-05-16) page 14, paragraph 2 page 19; example 1 claims 141-150	1-13
X	--- BONYHADI M ET AL: "Xcellerate: An autologous T cell immunotherapy approach for treating B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL)" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 837a XP000926673 ISSN: 0006-4971 the whole document --- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 2003

Date of mailing of the international search report

25/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Young, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/D/01825

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 100 50 935 A (TEGENER O GMBH) 2 May 2002 (2002-05-02) cited in the application page 3, line 54-59 -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

DE03/01825

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claim 10 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/D.../01825

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002058019 A1	16-05-2002	US 2003124122 A1	03-07-2003
		US 2003119185 A1	26-06-2003
		US 2002119568 A1	29-08-2002
		AU 4328801 A	03-09-2001
		CA 2406864 A1	30-08-2001
		CN 1419597 T	21-05-2003
		EP 1257632 A1	20-11-2002
		WO 0162895 A2	30-08-2001
DE 10050935 A	02-05-2002	DE 10050935 A1	02-05-2002
		AU 2346202 A	22-04-2002
		WO 0230459 A1	18-04-2002
		EP 1331944 A1	06-08-2003

## INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/D/01825

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K39/44 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2002/058019 A1 (BONYHADI MARK ET AL) 16. Mai 2002 (2002-05-16) Seite 14, Absatz 2 Seite 19; Beispiel 1 Ansprüche 141-150	1-13
X	BONYHADI M ET AL: "Xcellerate: An autologous T cell immunotherapy approach for treating B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL)" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, Bd. 96, Nr. 11 Part 1, 16. November 2000 (2000-11-16), Seite 837a XP000926673 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument	1-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Young, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

PCT/D/8/01825

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DE 100 50 935 A (TEGENER O GMBH)  2. Mai 2002 (2002-05-02)  in der Anmeldung erwähnt  Seite 3, Zeile 54-59  -----</p>	1-13

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Obwohl der Anspruch 10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/D/01825

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002058019 A1	16-05-2002	US 2003124122 A1	03-07-2003
		US 2003119185 A1	26-06-2003
		US 2002119568 A1	29-08-2002
		AU 4328801 A	03-09-2001
		CA 2406864 A1	30-08-2001
		CN 1419597 T	21-05-2003
		EP 1257632 A1	20-11-2002
		WO 0162895 A2	30-08-2001
DE 10050935 A	02-05-2002	DE 10050935 A1	02-05-2002
		AU 2346202 A	22-04-2002
		WO 0230459 A1	18-04-2002
		EP 1331944 A1	06-08-2003